



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁴ : C12Q 1/68</p> | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/ 00206 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Januar 1989 (12.01.89)</p> |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE88/00384 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juni 1988 (27.06.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 21 400.4 (32) Prioritätsdatum: 29. Juni 1987 (29.06.87) (33) Prioritätsland: DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BALAZS, Viktor [DE/DE]; Quellenweg 2, D-5068 Odenthal (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : BALAZS-FRÖH- LICH, Margit [DE/DE]; Quellenweg 2, D-5068 Oden- thal (DE). (74) Anwalt: BAUER, Wulf; Wolfgang-Müller-Str. 12, D- 5000 Köln 51 (DE).</p> | | <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p> |
| <p>(54) Title: PROCESS FOR TESTING A BIOLOGICAL FLUID FOR CELLULAR ONCOGEN DNA OR FRAG- MENTS THEREOF (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG EINER BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEIT AUF ZELLU- LARE ONKOGEN-DNA BZW. DEREN FRAGMENTE (57) Abstract In the process, the DNA in the whole of the acellular biological fluid, preferably blood plasma, is concentrated or separated, the DNA product so obtained is denatured, and in this form is either immobilized on a solid carrier or left free in solution. The DNA is brought into contact with labelled oncogen DNA or oligonucleotide samples, with which it is hybridized if complementary sequences are present. The excess and non-specifically bound labelled oncogen DNA or oligonucleotide samples are removed, and the product tested for the presence of labelled DNA or oligonucleotide. Following concentration or separation of the DNA, enzymatic amplification in vitro of the plasma DNA can be carried out, in order to augment the specific target sequences of the oncogens. The process is suitable as a universal malignity test. (57) Zusammenfassung Bei dem Verfahren wird die DNA aus der gesamten azellularen biologischen Flüssigkeit, vorzugsweise aus dem Blutplasma konzentriert bzw. getrennt, das so erhaltene DNA-Produkt wird denaturiert und in dieser Form entweder auf einem festen Träger immobilisiert oder frei in Lösung belassen. Die DNA wird mit markierten Onkogen-DNA- oder Oligonukleotid-Proben in Kontakt gebracht, um diese mit der DNA zu hybridisieren, wenn komplementäre Sequenz vorliegt. Die überflüssige und nicht spezifisch gebundene markierte Onkogen-DNA- oder Oligonukleotid-Proben werden entfernt und das Produkt auf die Anwesenheit markierter DNA oder Oligonukleotid bestimmt. Im Anschluß an das Konzentrieren bzw. Trennen der DNA kann eine enzymatische Amplifizierung in vitro mit der Plasma-DNA durchgeführt werden, um die spezifischen Target-Sequenzen der Onkogene zu vermehren. Das Verfahren eignet sich als Universal-Malignitätstest.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | FR | Frankreich | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GA | Gabun | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| BJ | Benin | JP | Japan | SD | Sudan |
| BR | Brasilien | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SN | Senegal |
| CG | Kongo | LI | Liechtenstein | SU | Soviet Union |
| CH | Schweiz | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CM | Kamerun | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| DE | Deutschland, Bundesrepublik | MC | Monaco | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| DK | Dänemark | MG | Madagaskar | | |
| FI | Finnland | ML | Mali | | |

Bezeichnung: Verfahren zur Untersuchung einer biologischen Flüssigkeit auf zelluläre Onkogen-DNA bzw. deren Fragmente

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von zellulärer Onkogen-DNA, bzw. deren Fragmente, nach dem Oberbegriff des Anspruch 1.

Verfahren zur Feststellung der zellulären Onkogen-DNA einschließlich Trennung von DNA, Denaturierung und Hybridisierung und dgl. sind auf dem Gebiet der molekularbiologischen Forschung bekannt. Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit, Spezifität und extreme Sensitivität der in vitro Hybridisierung zwischen DNA und DNA, sowie zwischen RNA und DNA sind aus der Literatur bekannt, die als Standardmethode für spezifische Problemlösungen Anwendung gefunden hat.

Die Hybridisierung mit DNA unter Verwendung von festem Substrat zur Immobilisierung ist seit 1965 bekannt (J. Mol. Biol. 12: 829-942; 1965). Seitdem wurden mehrere Verbesserungen dieser Methode sowie der Methoden der Trennung der DNA aus Zellen und Geweben veröffentlicht.

Die erhöhte Aktivität von zwei oder mehreren zellulären Onkogenen durch Mutation, Verstärkung (Amplifikation) oder andere Störungen der Gen-Regulation ist eine wesentliche Ursache der malignen Transformation und der Diversifikation der bösartigen Zellen.

Amplifikation der zellulären Onkogene auf z. B. das Zweifache bis Hundertfache, kommen als Ursache der malignen Transformation am Anfang in Frage oder treten während der Progression oder der Diversifikation der bösartigen Zellen in Fällen von 30 % bis 50 % der bösartigen Krankheiten auf. Nicht alle Sorten von Onkogenen haben die Neigung zu Amplifikation. Interessanterweise haben diejenige Onkogene diese Neigung, die in aktivierter Form am häufigsten in bösartigen Krankheiten vorkommen; drei aus vier in Gruppe A, zwei aus acht in Gruppe B und null aus sechs in Gruppe C, die Gruppen sind auf Seite 16 angegeben.

Durch Punkt-Mutation entstehende, neue, in normalem Zustand nicht vorhandene Onkogene sind in 15 % bis 30 % der Fälle von bösartigen Krankheiten mit dem Transfektionsverfahren in 3T3 NIH Zellen nachweisbar. Es ist neuerdings bekannt, daß die Mutation in wesentlich höherem Prozentsatz (40 %) der bösartigen Fälle eine bedeutende Rolle spielt.

Die folgenden Ursachen und Umstände kann man als maßgebend betrachten, für den veränderten DNA-Inhalt des Blutplasmas in bösartigen Krankheiten möglicherweise verantwortlich zu sein:

1. Amplifizierung der Onkogene, die das Mehrfache bis zu mehrfach Hundertfache des normalen Zustandes erreichen kann.
2. Neue Onkogene, die durch Mutation auftreten und in normalen Zellen überhaupt nicht vorhanden sind.
3. Erhöhte Leckage von DNA bzw. deren Fragmente aus den malignen Zellen
 - a) aus lebenden Zellen durch defekte Membranen,
 - b) aus sterbenden oder toten bösartigen Zellen.
4. Gesteigerter Zell-Umsatz in bösartigen Zuständen.
5. Größere Sterberate der bösartigen Zellen.
6. Erhöhte Permeabilität der Kapillaren und Gefäße in den bösartigen Tumoren für Zellen und Makromoleküle wegen der ungeeigneten und unvollständigen Entwicklung der sonst reichlich vorhandenen Gefäße.
7. Akkumulation der bösartigen Zellen, hauptsächlich sterbender Zellen, in den Kapillaren und Arteriolen der malignen Tumore, so können Zellelemente und Makromoleküle ohne größeren Abbau direkt in die Blutbahn langen.
8. Erhöhte Resistenz der DNA gegen degradierende Enzyme, weil sie geschützt sind wegen
 - a) Bindung zu Proteine,
 - b) Bindung zu RNA als DNA-RNA Komplexe, und
 - c) Anwesenheit in ds.DNA Form.
9. Längerer Aufenthalt in der Blutbahn, weil die Clearance-Mechanismen, die für die Entfernung der DNA bzw. deren Fragmente aus der Kreislauf verantwortlich sind, wegen der ständigen "Überflutung" der Zirkulation mit diesen Substanzen in den bösartigen Zuständen, oder

wegen noch nicht bekannter Ursachen, ausgeschöpft sind.

Diese Ursachen und Umstände sind in verschiedenen Kombinationen und in verschiedenem Maße in den verschiedenen Sorten von bösartigen Krankheiten und in deren verschiedenen Phasen für den veränderten DNA-Inhalt in der Blutbahn verantwortlich.

Da die rechtzeitige Erkennung die wichtigste Voraussetzung für eine Remission bzw. für die Heilung bösartiger Krankheiten ist, ist ein Universal-Malignitätstest notwendig, der im breiten Spektrum maligner Krankheiten schon relativ kleine Mengen maligner Zellen aufspüren bzw. nachweisen kann.

Einen derartigen universalen Test gibt es noch nicht. Nur zwei Verfahren haben bis jetzt als Verlaufskontrolltest routinemäßig Anwendung gefunden: Der Alpha-Feto-Proteintest für Leberkrebs und Teratocarcinom und das carcinoembryonale Antigen (CEA) für Krebsarten des digestiven Systems, die CEA produzieren.

In 1985 wurde ein Flotationsverfahren mit 16 stündigem Ultrazentrifugieren des Serums bekannt, das eine auf Krebs charakteristische Lipoprotein-Fraktion nachweisen kann, die auch RNA mit Poly(A)⁺RNA Komponenten enthält. Dieses Verfahren wurde aber in präkanzerösen Zuständen, in benignen monoklonalen Gammopathien und in vielen anderen Zuständen noch nicht erprobt. Die Sensitivität dieses Flotationsverfahren ist relativ gering, 0.2 Mikrogramm/ml, im Vergleich zu dem hochgradig sensitiven Hybridisierungsverfahren. Damit kann man vielleicht erklären, daß das Flotationsverfahren in einigen klinisch gesicherten Krebsfällen negativ ausgefallen ist. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die RNA in der Lipoprotein Fraktion nur ein Teil der Gesamt-Plasma-Nuklein-Säuren ist, die aus den bösartigen Zellen in die Blutbahn gelangt sind. (Gesamt-Plasma-Nuklein-Säuren bösartigen Ursprungs). Ferner ist die lange Ultrazentrifugation ein großer Nachteil des Flotationsverfahrens.

Jüngstens wurden auch zwei Immuntests als diagnostische Krebs-Tests

vorgeschlagen. Ein Verfahren für die Isolierung des sogenannten "Cancer Associated Protein" (CAP) wurde veröffentlicht mit der Absicht der Verwendung als ein Krebstest (Immuntest).

In 1985 wurde als Möglichkeit für Krebstests der Nachweis im Urin von Onkogen-Polypeptiden durch monoklonalen Antikörper mittels Immunoblot gedacht. Mit Polypeptiden von drei Onkogenen durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, daß der Unterschied zwischen normalen und pathologischen Werten nicht sehr groß ist und die Schwangerschaft höhere Werte produziert als eine bösartige Krankheit. Für die vollständige Beurteilung muß jedes Onkogen-Polypeptid für verschiedene Größen untersucht werden, was ein sehr großer Zeit- und Materialaufwand ist. Ferner zeigten die normalen Werte eine große Streuung und so kann ein bedeutendes Überlappen der normalen und der pathologischen Werte vorkommen. Zum Beispiel Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen nur ein Onkogen-Polypeptid zeigten positive Werte in 25-29% der bösartigen und in 6-9% der nicht-bösartigen Fälle.

Ein sehr wesentlicher Nachteil dieser wie jeder anderen Methode, die auf dem immunologischen Nachweis der Proteine oder Polypeptiden von Krebszellursprung basieren, ist, daß die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern, die durch den Wirt gebildet, oder für Therapie Zwecke eingeführt werden, unrealistische Ergebnisse verursachen und überhaupt ein bedeutender Störfaktor sein können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Nachweis der DNA, bzw. deren Fragmente, von zellularen Onkogenen in einer azellularen biologischen Flüssigkeit, wie Blutplasma anzugeben. Da es hierfür notwendig ist, erst die DNA aus dem Blutplasma zu trennen, ist es eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein zuverlässiges Verfahren zur Trennung der DNA aus dem Blutplasma anzugeben.

Durch die Behandlung des Blutplasmas zur Trennung des DNA-Inhaltes, durch Unterziehen der DNA einer enzymatischen Amplifizierung in vitro, durch Immobilisierung der DNA in denaturierter Form an einem festen Substrat und durch Kontakt des festen Substrats mit der markierten

denaturierten Onkogen-DNA um diese miteinander, wenn die Plasma-DNA und Onkogen-DNA-Probe komplementäre Sequenz(en) haben, zu binden (zu hybridisieren), wird ein zuverlässiges Nachweisverfahren erreicht. Diese Tatsache wird durch den Nachweis der Markierungssubstanz, oder im Falle der radioisotopischen Markierung durch Autoradiographie bestimmt.

Die in die Blutbahn gelangte DNA, deren Fragmente aus dem Blutplasma extrahiert werden können, kann dessen Onkogen-Inhalt durch in vitro molekulare Hybridisierung nachgewiesen werden. Der Nachweis von Onkogenen bzw. deren Fragmente im Blutplasma durch in vitro Hybridisierung ist umso mehr geeignet für diesen Zweck, weil sie nicht nur äußerst spezifisch sondern auch hochgradig empfindlich ist und so wenig wie 0,5 bis 2 pg DNA/ml spezifisch nachgewiesen werden kann. Durch die Kombination der in vitro Amplifizierung der Target-Sequenzen der Onkogene mit der in vitro Hybridisierung erhöht sich die Empfindlichkeit der Methode um mehr als zwei Größenordnungen.

Erfindungsgemäß werden die Gesamt-Plasma DNA wie die in die Blutbahn gelangte DNA, bzw. deren Fragmente aus dem Blutplasma von Patienten mit bösartigen und nicht bösartigen Krankheiten isoliert und auf die Anwesenheit der DNA zellulärer Onkogene mit in vitro molekularer Hybridisierung untersucht.

Man konnte feststellen, daß Plasma-DNA in nicht-malignen und malignen Zuständen isoliert werden kann. Wenn die isolierte DNA des Blutplasmas auf Onkogen-Inhalt durch molekulare Hybridisierung in vitro mit markierten Onkogen-DNA Proben untersucht wurde, konnten wesentliche Unterschiede (qualitative und quantitative) zwischen bösartigen und nicht-bösartigen Krankheiten festgestellt werden.

Die qualitativen und quantitativen Unterschiede ermöglichen, daß erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung der Onkogen DNA im Blutplasma als Nachweis auf aktive maligne Prozesse angewendet werden kann. Die praktische Anwendbarkeit des Verfahrens zur Feststellung der DNA, bzw. deren Fragmente, von zellulären Onkogenen aus menschlichem Blutplasma ist ein Universal-Malignitätstest für den Nachweis bösartiger

Prozesse.

Der wesentlichste Vorteil dieser Erfindung ist es, daß sie ein Verfahren angibt, das als Universal-Malignitätstest dienen kann: Dieser Test beruht auf den Grundprinzipien der bösartigen Transformation durch die Aktivierung von zellularen Onkogenen und der Besonderheiten der bösartigen Zellen und Tumore.

Der zweite bedeutende Vorteil dieses Verfahrens ist die große Empfindlichkeit (1 pg/ml).

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Erfindung ist im Gegenteil zu Immuntests, daß die spezifischen Antikörper, die sich durch den Wirt gebildet haben, oder die für Therapie Zwecke in die Blutbahn eingeführt wurden, die Ergebnisse nicht beeinflussen können.

Gegenüber Nachweisverfahren, die auf immunologischem Nachweis der Proteine oder Polypeptiden von Krebszellursprung basieren, hat das erfindungsgemäße Verfahren den Vorteil, daß eine Störung des Ergebnisses durch spezifische Antikörper entfällt.

Dieses Verfahren hat auch den Vorteile, daß die Gefahr des Abbaus der DNA ist wesentlich kleiner ist.

Der größte Vorteil ist, daß der Nachweis der Onkogen-DNA fähig ist, zu beweisen, daß die Aktivierung des Onkogens durch Punktmutation verursacht wurde und welcher Punkt des Onkogens durch Mutation verändert wurde. Aus diesem Grund kann man wissen, wie das Onkogen-Produkt (OKP) verändert ist. Alle ras Onkogene können in der Position 12, 13, 61 durch Punktmutation verändert werden. Die Mutation betrifft besonders das ras^{K1} Onkogen, und zwar in der Position Codon 12. Diese Veränderung führt zu einem Onkogenprodukt, in dem die Aminosäure gly in der Position 21 (p21) mit val (besonders in Kolon und Harnblase-Krebs), arg (besonders in Lungenkrebs) oder mit cys (besonders in Lungenkrebs) verwechselt wird. Oligonukleotid-Proben für diese Onkogene zum Zweck dieser Hybridisierung sind im Handel erhältlich (Oncogene Science Inc.,

Mineola, NY 11501).

Da dieses Onkogen-Produkt nur in den Tumorzellen vorhanden ist und in den normalen Zellen überhaupt nicht anwesend ist, bietet dieses durch Mutation veränderte Onkogen-Produkt diagnostisch und therapeutisch einen einmaligen ausschließlichen spezifischen Angriffspunkt an den bösartigen Zellen.

So kann man, zum Beispiel, durch Immunoimaging, intravenöse Verwendung von monoklonalen Onkogen-Produkt Antikörpern, verbunden mit einem Radioisotop, bösartige Zellen im Körper schon in einem Stadium der bösartigen Krankheit, wenn die üblichen bildgebenden Maßnahmen noch negative Resultaten geben, visualisieren.

Mit monoklonalen anti-OKP spezifischen Antikörpern, allein oder in Verbindung mit radioaktiven oder chemotherapeutisch wirkenden Substanzen, oder durch Hemmung der translationalen Aktivität der entsprechenden Onkogen-Transkripte (mRNA) kann man ausschließlich nur die bösartigen Zellen beeinflussen bzw. vernichten, ohne die normalen Zellen zu beschädigen.

Der Nachweis zellulärer Onkogen-DNA bzw. deren Fragmente aus dem Blutplasma bietet weitere, für die Therapie maßgebende Informationen:

1. a. Der Grundcharakter maligner Prozesse und ihr Verhalten im Wirt ist wesentlich dadurch bestimmt, welche Onkogene aktiviert wurden (Genetic Scripture, Zell-Onkogenprofil). Dies konnte bisher nur histologisch in Tumorgewebe durch in vitro Nukleinsäure-Hybridisierung bestimmt werden. Der erfindungsgemäße Malignitätstest kann diese Auskunft zumindest teilweise aus dem Blutplasma liefern (Plasma-Onkogen-Profil), lange bevor die relativ kleine Tumorzellmasse visualisierbar und für histologische Untersuchungen erreichbar ist.
- b. Während der malignen Prozesse in vitro sowie während des Bestehens der bösartigen Krankheit in Patienten können neue Onkogene zusätz-

lich aktiviert werden, was zu einer bedeutenden Progression der Bösartigkeit führen kann. Diese Gefahr kann mit dem Malignitätstest während der Verlaufskontrolle frühzeitig dadurch erkannt werden, daß eine neue Onkogen-DNA aus dem Blutplasma identifiziert wird, welche bisher im Plasma nicht vorhanden war.

- c. Der Nachweis der Onkogen-DNA ist besonders geeignet, um die Amplifikation der Onkogene zu untersuchen und zu beobachten. Während des Krankheitsablaufs kann eine Verstärkung (Amplifikation) der aktivierten Onkogene auftreten, wodurch eine wesentlich erhöhte Aggressivität und Progression der bösartigen Zellen verursacht werden kann. Das Auftreten einer solchen Verstärkung kann mit dem quantitativ ausgeführten Malignitätstest schon frühzeitig während der Verlaufskontrolle beobachtet werden. Das bedeutet, daß ein Subklon der Tumorzellen, der das amplifizierte Onkogen hat, frühzeitig, bevor er sich ausbreiten konnte und die Prognose sehr verschlechtern könnte, erkannt werden kann. Dieser Subklon kann im Frühstadium durch spezifische Immuntherapie oder Immunchemotherapie beeinflusst und gegebenenfalls vernichtet werden. Amplifikation der zellularen Onkogene (auf das Zwei- bis Hundertfache) tritt entweder im Primertumor oder während der Progression und Diversifikation der bösartigen Zellen und in ungefähr 30 % bis 50 % der Fälle der bösartigen Krankheiten auf.

2. Genprodukte der aktivierten zellularen Onkogene spielen eine wichtige, sogar vitale Funktion in den transformierten bösartigen Zellen, viele von ihnen fungieren als Protein-Kinase-Enzyme in der Zellmembran.

Die Veränderung bzw. Beeinträchtigung dieser Funktion durch Angriff auf die bösartigen Zellen immunspezifisch, gezielt auf ihre Onkogenprodukte mit monoklonalen Antikörpern allein oder gebunden mit radioaktiv oder chemotherapeutisch wirkenden Substanzen kann zur heilenden Wirkung führen, bevor die Tumorzellmasse sich verbreiten konnte. Ein Plasma-Onkogenprofil bei Früherkennung zeigt die spezifischen Therapieoptionen. Die Verlaufskontrolle mit neuen Onkogen-Proben er-

möglichst es, neu aufgetretene Onkogen-DNA zu erkennen. Ein quantitativ durchgeführter Malignitätstest bietet während des Krankheitsverlaufs eine Früherfassung einer eventuellen Amplifizierung eines zellularen Onkogens und gibt spezifische Hinweise, wie man diesen neuen Subklon von bösartigen Zellen unterdrücken bzw. vernichten kann, bevor eine größere Progression oder Aggressivität verursacht ist.

Die Kombination von in vitro enzymatischer Amplifizierung mit der in vitro (Oligonukleotide) Hybridisierung erhöht die Empfindlichkeit der Methode um mehr als zwei Größenordnungen. Dieses kombinierte Verfahren übertrifft hinsichtlich der Sensitivität alle zur Zeit möglichen Methoden, inbegriffen ELISA, für den Nachweis von Onkogen-Produkten.

Die Erhöhung um zwei Größenordnungen der Sensitivität eines Malignitätstests bedeutet einen therapeutisch sehr wichtigen Vorsprung von mehreren Monaten in der Früherkennung maligner Prozesse und deren Rekurrenz nach durchgeführter Therapie.

Da die durch Punktmutation veränderten und so aktivierten Onkogene in den normalen Zellen überhaupt nicht vorkommen, ist der Nachweis dieser Onkogene immer von einer großen diagnostischen Bedeutung. Zwar wurden durch Mutation aktivierte ras Onkogene gelegentlich in einigen Präkanzerosenzuständen aus Geweben nachgewiesen, aber damit die DNA oder deren Fragmente dieser Onkogene in die Blutbahn gelangen können, sind die Besonderheiten der malignanten Transformation und der bösartigen Tumore notwendig.

Im folgenden wird die Erfindung genauer erläutert.

Aus dem frischgewonnenen Blut wird das Plasma schnell separiert. Dann wird das Plasma mit einem Detergens, wie Natriumduodezylsulphat (SDS) und einem proteolytischen Enzym, wie Proteinase K (Boehringer Mannheim) mit einem wässrigen Medium vermischt und wird dann bei 37 Grad C für 1 bis 3 h in einer Pufferlösung (pH 7,5) inkubiert. Die viskose Mischung wird durch Vortexing periodisch umgerührt. Nach der Inkubation wird durch organisches Lösungsmittel, wie Phenol, dreimal extrahiert. Das Ergebnis ist eine organische Phase, die den größten Anteil

der Proteine, und eine wässrige Phase, die im wesentlichen die gesamte DNA enthält. Phenol wird nach Zentrifugieren entfernt. Die Interphase wird mit zusätzlichem Phenol und Puffer reextrahiert. Nach der dritten Extraktion wird die DNA in Anwesenheit von 0,25 M Na-azetat bei pH 5,2 mit eiskaltem Äthanol bei -20 Grad C inkubiert, präzipitiert und zentrifugiert. Das DNA-Sediment (das nicht immer sichtbar ist) wird in dem gewünschten Puffer oder der Lösung gelöst.

Die DNA wird einer DNase-Enzym-freien RNase-Behandlung bei 37 Grad C für 1 h unterzogen. Danach wird die DNA zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Äthanol wie oben präzipitiert und in dem gewünschten Lösungsmittel gelöst.

Die spezifischen Target-Sequenzen aller Onkogene können durch enzymatische Amplifizierung in vitro spezifisch wesentlich vermehrt werden.

Im Fall der durch Punktmutation veränderten Onkogene wird die Plasma-DNA einer solchen in vitro enzymatischen Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PKR) unterzogen, um die spezifischen, durch Punktmutation veränderten Sequenzen wesentlich zu vermehren.

Zwei Oligonukleotid-DNA Fragmente (je von 20 Basen), komplementär zu den Sequenzen, die das Target-Kodon flankieren, werden als Primere benutzt, um die angrenzenden Sequenzen, welche das mutierte Kodon haben, durch das Klenow-Fragment von Escherichia coli DNA-Polymerase I zu kopieren nach dem Prinzip von Saiki und Mitarbeiter (Science 230: 1350 - 1354, 1985). Annealing der Oligomer-Primere zu den entsprechenden denaturierten Onkogen-DNA aus dem Blutplasma wird durch Synthese der neuen Fragmente, die die Target Sequenz enthalten, unter der Wirkung des Enzyms und in der Anwesenheit von Deoxynukleotid-Triphosphat fortgesetzt. Die neu synthetisierte Target Sequenz dient als weiterer Templat-Strang für die Oligonukleotid-Primere und für das Enzym. Wiederholte Zyklen von Denaturierung, Primer-Annealing und Kettenelongation verursachen eine exponentielle Vermehrung der Target Sequenzen.

So ergeben z. B. 20 - 25 Zyklen Amplifizierung in vitro in 2 bis 2,5 h eine etwa 200.000-fache Vermehrung der spezifischen Target-Sequenzen.

Die so vermehrten Onkogen-DNA Sequenzen werden denaturiert und auf vorbereitete Nylon-Filter aufgetragen, dann entweder durch UV-Licht oder Backen in Vakuum-Ofen immobilisiert. Die Nylon-Filter werden dann so behandelt, daß das Binden weiterer Nuklein Säuren verhindert wird. Die so behandelten Filter werden mit verschiedenen Oligonukleotid-Onkogen Proben, die das durch Punktmutation veränderte Kodon enthalten, in Kontakt gebracht.

Um die durch Punktmutation veränderten Onkogen-Sequenzen in der Plasma-DNA vor und besonders nach der in vitro enzymatischen Amplifizierung zu identifizieren, wird die DNA mit markierten Oligonukleotid-Onkogen-Proben, die das mutierte Kodon haben, in vitro hybridisiert. Die so geformten Hybrid-Duplexe sind dann stabil, wenn das Match perfekt ist. Im Falle von Mismatch sind die Hybrid-Duplexe nicht so stabil. Diese Unterschiede werden ausgenutzt, um die Mismatch-Duplexe durch Auswahl der Temperatur, der Ion-Stärke und der Zusammensetzung der Waschlösung besonders beim Waschen (nach Empfehlung des Herstellers) zu eliminieren und die durch perfektes Match entstandenen Hybrid-Duplexe zu behalten. Deren Anwesenheit wird dann durch Autoradiographie nachgewiesen.

Wenn die Plasma-DNA auf nicht-mutierte Onkogene ohne in vitro Amplifizierung untersucht wird, wird die im Wasser gelöste DNA denaturiert durch Erhitzen auf 100 Grad C für 10 min und durch Mischen mit gleichem Volumen 1 M NaOH, und bei Zimmertemperatur 20 min inkubiert. Dann wird das Alkali neutralisiert auf einen neutralen Wert (pH 8,0) durch Zumischung von 1 M HCl und die Salzkonzentration wird durch Zugabe von 1 M NaCl, 0,3 M Na-zitrat, 0,5 M Tris.CL (pH 8,0) erhöht. Dann wird in Eis gekühlt. Die Erhöhung der Salzkonzentration dient der Erhöhung der Bindefähigkeit der DNA an das feste Substrat (siehe unten).

Die resultierende Lösung von denaturierter DNA wird in gewünschter Menge auf einem festen Substrat, wie reine Nitrozellulose, aufgetra-

gen, um eine Immobilisierung der denaturierten DNA an dem festen Substrat zu bewirken. Das resultierende feste Substrat wird einer Wäsche bei Zimmertemperatur mit 50 ml vol 6 x SSC unterzogen und getrocknet, dann in einem Vakuumherd bei 80 Grad C für 2 h gebacken. Das gebackene feste Substrat wird danach behandelt, um ein weiteres Binden von Nukleinsäure an das feste Substrat zu verhindern.

Die (radioisotopisch oder nicht-radioisotopisch) markierte Onkogen DNA-Probe wird denaturiert und in einer Lösung mit dem festen Substrat, auf dem die Plasma-DNA schon immobilisiert ist, in Kontakt gebracht, um damit unter ausgewählten thermischen und chemischen Bedingungen zu hybridisieren. So wird bewirkt, daß die markierte Onkogen DNA-Probe durch Wasserstoffbindungen mit der komplementären Sequenz(en) der auf dem festen Substrat immobilisierten Plasma-DNA, wenn sie diese komplementären Sequenzen haben, verbunden (hybridisiert) ist.

Nach einem vorbestimmten Zeitraum wird das feste Substrat einer Wäsche unterzogen, um die nicht spezifisch gebundene, markierte Onkogen DNA-Probe zu entfernen.

Das feste Substrat wird anschließend einer Analyse unterzogen, um das Stattfinden der Hybridisierung zwischen der Plasma-DNA und der markierten Onkogen-DNA Probe nachzuweisen. Das wird im Falle der radioisotopischen Markierung durch Autoradiographie, im Falle der nicht-radioisotopischen Markierung durch Nachweis der Markierungssubstanz mittels Enzymaffinitätstest durch Farbreaktion bestimmt.

Eine Menge von gereinigter molekularisch klonierter DNA, die die Sequenz als Kode für Onkogen enthält, wird entweder radioisotopisch oder nicht-radioisotopisch markiert. Die radioisotopische Markierung wird durch Nick-Translation nach Rigby et al. (J. Mol. Biol. 113:237-251, 1977) im Fall von oligonukleotid Onkogen Proben durch Endmarkierung durchgeführt, um hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Für diese Verfahrensweise verwendbare Radioisotope sind beispielsweise besonders ^{32}P aber auch ^{125}I , ^{131}I und H^3 .

Die nicht-radioisotopische Markierung der Onkogen-DNA Proben wird beispielsweise mit Biotin, auch durch Nick-Translation (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6633-6637, 1981) und jüngstens mit Photobiotin (Nucleic Acid Research 13: 745-761, 1985) durchgeführt. Die Markierung mit Photobiotin ist besonders unkompliziert, schnell und preisgünstig. Ein Photobiotin-Markierungs- und Nachweis-Kit wird kommerziell angeboten (BRESA, Adelaide, South Australia). Die Markierung mit Biotin hat einen sehr wichtigen Vorteil: Abgesehen davon, daß sie nicht radioaktiv ist, kann man Ergebnisse innerhalb einiger Stunden durch Farbreaktion sehen. Man muß nicht Tage warten, wie bei der Autoradiographie.

Onkogen-DNA Proben, Onkogen-Oligonucleotid-Proben, markiert oder unmarkiert, sind kommerziell erhältlich (ONCOR, Inc. Gaithersburgh, Ma. USA 20877; ONCOGENE SCIENCE Inc. Mineola, NY. 11501 USA).

Das folgende Beispiel dient zur weiteren Erläuterung der Erfindung, ohne sie zu beschränken:

Beispiel

Es wird 20 ml Blut mit 20 IE/ml Heparin entnommen und das Blutplasma wird so schnell wie möglich separiert. Es wird in zwei Einweg Plastik-Zentrifugen-Röhrchen je 5 ml Blutplasma pipettiert. Eines wird tiefgekühlt für eventuelle Wiederholung, oder für ergänzende Untersuchungen als Reserve aufbewahrt. Das andere wird gleich in Bearbeitung genommen.

Es wird ein Gemisch aus 0,4 M Tris.Cl (pH 7,5); 50 mM Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA); 0,6 M NaCl; 2 % (Gew/Vol) Natriumduodecylsulfat (SDS) und Proteinase K (Endkonzentration 200 mikrogramm/ml, Boehringer) hinzugefügt und bei 37 Grad C für 1 bis 3 h inkubiert mit häufigem Vortexing.

Anschließend wird gleiches Volumen von Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) eingemischt und durch Schütteln extrahiert, sodann durch Zentrifugieren die organische und die unorganische (wässrige) Phase getrennt. Die unorganische Phase wird separiert und aufbewahrt. Die Interphase wird mit Phenol-Chloroform wie oben extrahiert. Die wässrigen Phasen werden gemeinsam wieder mit Phenol und Chloroform noch zweimal extrahiert.

Nach der dritten Extraktion wird zu der wässrigen Phase Natriumazetat von 2,5 M (pH 5,2) zugemischt, um die Endkonzentration von 0,25 M zu erreichen. Zwei Volumina von eiskaltem Äthanol werden zugefügt, gut vermischt und bei -20 Grad C inkubiert und danach zentrifugiert.

Das DNA-Sediment (nicht immer sichtbar!) wird in TE (pH 8,0) (10 mM Tris.Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und mit DNase-freier RNase (Endkonzentration 10 mikrogramm/ml) bei Zimmertemperatur für 60 min inkubiert, danach wird mit Phenol-Chloroform zweimal extrahiert und mit Äthanol wie oben präzipitiert.

Die Extrahierung der DNA ist wesentlich erleichtert und es wird eine serienweise Untersuchung ermöglicht durch die Anwendung des Instruments "Nucleic Acid Extractor" (Analytic Biosystem, Foster City, Ca, 94404,

USA). Das oben geschriebene Verfahren ist leicht adaptierbar für den "Nucleic Acid Extractor".

Bei der Untersuchung der nicht-mutierten Onkogene wird die Plasma-DNA gelöst in Wasser in der gewünschten Konzentration auf 100° C für 10 min erhitzt, dann schnell in Eis gekühlt, mit gleichem Volumen von 1 M NaOH gemischt und bei Zimmertemperatur für 20 min inkubiert. Damit wurde die Denaturierung der DNA erreicht.

Die denaturierte DNA wird mit einer Lösung von 1 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, 0,5 M Tris.Cl (pH 8,0) und 1M HCl gemischt, dann in Eis gekühlt.

Ein entsprechendes Volumen von der resultierenden Lösung (10 Mikrogramm DNA) wird auf einem festen Substrat wie reines Nitrozellulose aufgetragen, wobei das entsprechende Volumen von der denaturierten DNA Lösung in eine Vertiefung einer "Mikrofilter"-Platte mit 96 Vertiefungen eingebracht (Minifold I Filtration und Inkubations-Platte, Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, 03431, USA) (Bio-Rad, Richmond, Ca, 94804, USA) und unter gelindem Vakuum unter Bildung eines Flecks von 3,0 mm Durchmesser, filtriert wird. Der resultierende Filter wird von einer Lösung von 50 ml von 6 x SSC bei Zimmertemperatur gewaschen, getrocknet und bei 80 Grad C für 2 h im Vakuumherd gebacken.

Nach dem Backen wird der resultierende Filter einer Behandlung, der sogenannten Prehybridisierung in Prehybridisierungslösung unterzogen. Prehybridisierungslösung: Formamid 50% (Vol/Vol); 5 x Denhardt's Lösung; 5 x SSPE; 0,1 % SDS; 100 Mikrogramm/ml denaturierte DNA aus Heringssperma und 1 Mikrogramm/ml Poly A. (Denhardt's Lösung: Ficoll 5 g; Polyvinylpyrrololidon 5 g; Rinderserumalbumin (Pentax Fraktion V. 5 g und H₂O zu 500 ml). Der Filter wird in dieser Prehybridisierungslösung bei 42 Grad C für 6 - 8 h inkubiert. (20 x SSPE: 174 g NaCl; 27,6 g NaH₂PO₄; 7,4 g EDTA ad 1 Liter H₂O, pH 7,4).

Die markierte DNA-Onkogen Probe wird durch Erwärmung auf 100 Grad C für 5 min denaturiert und schnell in Eis abgekühlt. In denaturierter Form wird zu die Prehybridisierungslösung, in der der Filter schon inkubiert

ist, zugemischt und weiter inkubiert bei 42 Grad C für 12 - 20 h.

Nach der Inkubierung wird die Lösung, in der die Inkubation durchgeführt wurde, weggegossen und der Filter 3 - 4 mal für 5 - 10 min (je Wäsche) einer Wäsche bei Zimmertemperatur im großen Volumen von 2 x SSC und 0,1 % SDS unterzogen. Der Filter wird zwei weiteren Wäschen für 1 - 1,5 h in einer Lösung von 1 x SSC und 0,1 % SDS bei 68 Grad C unterworfen. Wenn der Hintergrund noch immer hoch ist, sind weitere Wäschen bei höheren Stringenzien (Schärfen) notwendig: Für 60 min in einer Lösung von 0,2 x SSC und 0,1 % SDS bei 60 Grad C.

Die folgenden, gut bekannten, käuflichen 18 molekularisch klonierten menschlichen Onkogene wurden als Onkogen-DNA Probe gebraucht, die hier ungefähr nach Häufigkeit ihres Vorkommens mit erhöhter Aktivität in menschlichen Bösartigkeiten gruppiert sind:

| In allen bzw. praktisch allen Bösartigkeiten: | in seltenen, nur in gewissen Formen von Bös- artigkeiten: | in sehr seltenen Formen von Bösar- tigkeiten: |
|--|---|---|
| A. | B. | C. |
| fos | fes | raf |
| myc | myb | Erb ^B |
| Ha-ras | fms | N-myc |
| Ki-ras | src | Erb ^A |
| | abl | alu |
| | | mos |
| | | sis |
| | | N-ras |

Oligonucleotid-Proben: ras^{Ki} (codon 12), siehe auch S. 6, waren durch Endmarkierung markiert.

Die Proben wurden radioisotopisch mit P³² markiert (spezifische Aktivität: 10⁸ cpm/mikrogramm) durch Nick-Translation nach Rigby et al (J. Mol. Biol. 133:237-251, 1977) oder unmarkiert erhalten. Die unmarkierten DNA Proben wurden entweder mit Biotin (nach Leary, Proc. Nat. Acad. Sci. 80:4045 - 4049, 1983) oder mit Photobiotin markiert. Reagenzien für die nicht-radioisotopische Markierung durch Nick-translation nach Rigby et

al (J. Mol. Biol. 133:237-251, 1977) mit Biotin und für die Visualisierung der Resultate der Hybridisierung mit Enymaffinitätsverfahren durch Farbreaktion werden in Handel angeboten (Amersham, Little Chalfont, England). Markierungen mit Photobiotin erfolgt nach Vorschrift des Herstellers (BRESA, Adelaide, South Australia): Nach kurzer Bestrahlung mit sichtbarem Licht geht Photobiotin eine stabile Bindung mit Nukleinsäuren ein. Die so mit Biotin markierte DNA kann mit 2-Butanol Extraktion mit Äthanol-Precipitation isoliert werden und kann als stabile markierte Probe für ein halbes Jahr in 0.1 mM EDTA bei -15 Grad C stabil aufbewahrt werden.

Das Nitrocellulose-Papier im Falle radioisotopischer Markierung wird zwischen klaren Azetatfolien eingesetzt und in die Nähe eines für die Röntgenstrahlen empfindlichen Filmes gebracht. Ein Verstärkerschirm wird an der entgegengesetzten Seite angebracht und lichtdicht verpackt. Nach einer bestimmten Zeit wird der Film entwickelt. Die Anwesenheit der DNA bzw. deren Fragmente, die mit der Onkogen-DNA Probe hybridisierten, wird durch die Anwesenheit eines Flecks auf dem Film bestimmt.

Im Falle nicht-radioisotopisch markierter Onkogen-DNA Proben, wie im Falle der mit Photobiotin markierten Onkogen-DNA Proben, werden die DNA Proben in 0.1 M EDTA aufgetragen, sonst wird die Prehybridisierung so ausgeführt wie mit radioisotopisch markierten DNA Proben, aber die Dauer der Prehybridisierung ist kürzer: 4-8 h. Die Hybridisierung wird durchgeführt wie mit radioaktiven Proben, aber bei höherer Temperatur (55 Grad C) für 20 h in einer Lösung: 4 Vol. Prehybridisierungspuffer; 1 Vol. von etwa 0.5 g/ml Natrium Dextransulfat und 20 ng/ml Biotin-markierte DNA Probe (Onkogen-DNA Probe).

Die getrockneten Nitrocellulose-Papiere werden bei 42 Grad C für 30 min in STMT Puffer (1 M NaCl; 0,1 M Tris. Cl. pH 7.5; 2 mM MgCl₂ 0.05% v/v Triton X-100) mit 30 mg von Bovin Serum Albumin inkubiert. Nachdem das Nitrocellulose-Papier getrocknet ist, wird es bei Zimmertemperatur für 10 min in STMT-Puffer mit 1 Mikrogramm/ml Sigma Avidin-alkalische Phosphatase-Komplex inkubiert, dann wird mit häufigem Schütteln in STMT Puffer (3 x 10 min) und STM Puffer (1 M NaCl, Tris. Cl pH 9.5, 5 mM MgCl₂) für

2 x 5 min inkubiert.

Für Farbreaktionen wird das Nitrocellulose Papier bei Zimmertemperatur im Dunkeln mit Substrat-Lösung (STM Puffer aber nur mit 0.1 M NaCl) mit 0.33 mg/ml Nitro-blau-tetrazolium, 0.17 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat und 0.33% v/v N,N-dimethylformamid vermischt. Die Reaktion wird durch Waschen des Nitrocellulose Papiers mit 10 mM Tris.Cl pH 7.5; 1 mM EDTA beendet.

Für die Amplifizierung in vitro wird 3 - 5 mikrogramm Plasma-DNA zu 300 - 500 mikroliter Buffer zusammengesetzt aus 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1,5 mM Deoxynukleotid-Triphosphat (dBTP, alle vier), 1 μ M je von der zwei Primeren in einem Plastik-Zentrifugenröhrchen zugemischt. Die Plasma-DNA wird durch Erhitzen bei 95 Grad C für 5 min denaturiert, dann zentrifugiert, um die Kondensation zu entfernen. Die Röhrchen werden gleich bei 30 Grad C für 2 min inkubiert, um die zwei Oligonukleotid-Primere zu ihren Target-Sequenzen durch Hybridisierung binden zu können (Annealing). Danach wird 6 - 10 mikroliter von Klenow Fragment des Escherichia coli DNA Polymerase I Enzymes (Biolabs, 0,5 Einheit/ul in 10 mM Tris.HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl und 10 mM MgCl₂) zugemischt. Diese Mischung wird zusätzlich noch für 2 min bei 30 Grad C inkubiert. Diese Zyklen von Denaturieren, Zentrifugieren, Annealing und Kettenelongation werden 19-24-mal wiederholt, die Zeit für die Denaturierung wird aber hier anstatt 5 min auf 2 min reduziert. Durch die 20 - 25 Wiederholung wird ein Endvolumen von 420 - 700 ul erhalten.

Ca. 110 - 200 ng der in vitro amplifizierten Plasma DNA wird auf Nylon-Filter (Zetabind oder Zetaprobe), die vorher 20x SSPE befeuchtet wurden, aufgetragen, dann werden die Filter einer Wäsche in 20x SSPE unterzogen und danach durch Backen bei 80 Grad C für 60 min immobilisiert, dann in 5x SSPE, 5x Denhardt's Lösung, 0,5 % SDS und 30 % Formamid für 4 h bei 42 Grad C inkubiert (prehybridisiert).

Die Hybridisierung wird mit P³²-endmarkierten Oligonukleotid-Onkogen-Proben (2×10^6 cpm/ml), die die mutierte Sequenz haben, im selben Buffer bei 42 Grad C für 18 h durchgeführt. Dann werden die Filter einer Wäsche

in 2x SSPE, 0,1 % SDS zweimal bei Zimmertemperatur für 30 min und danach in 5x SSPE, 0,1 SDS für 6 min für 60 Grad C und in Hybridisationsbuffer aber ohne Denhardt's Lösung und ohne Hering-Sperma-DNA für zwei kurze Wäschen bei Zimmertemperatur unterzogen. Schließlich wird eine Wäsche in diesem Buffer für 30 min bei 58 Grad C durchgeführt.

Die getrockneten Filter werden durch Autoradiographie bei -70 Grad C mit Verstärkungsschild (fürs Übernachten) ausgewertet.

Bei der frei in Lösung Hybridisierung wird die DNA in denaturierter Form frei in Lösung mit der markierten Onkogen-DNA Probe gemischt, inkubiert für 1 - 2 h bei 70 Grad C in Anwesenheit von Nuklease-Inhibitoren. Dann wird Hydroxyapatit zugeführt, für 5 min bei 70 Grad C inkubiert, um das Produkt der Hybridisierung (Plasma-DNA-markierte Onkogen-DNA Hybrid-Komplexe) zu adsorbieren.

Die so entstandene Hydroxyapatit-Fraktion, wird als Sediment durch Zentrifugieren separiert. Das Sediment wird einer Wäsche für 5 min bei 70 Grad C unterzogen und das Produkt im Vergleich zum Hintergrund in der Hydroxyapatit-Fraktion aufgrund der Markierung bestimmt.

Die erfindungsgemäße Arbeitsweise zum Nachweis der DNA bzw. deren Fragmente, von zellulären Onkogenen im menschlichen Blutplasma umfaßt mehrere günstige Reaktionsweisen und Schritte, um eine hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu ergeben.

Die Verwendung von Proteinase K erleichtert die Entfernung der Proteine, die Guanidinium-Isothiocyanat-Behandlung die Denaturierung der Proteine sowie die Spaltung der DNA-Protein Komplexe. Der Rest der Proteine wird durch organische Extraktion entfernt. Der Abbau und das Entfernen der RNA wird durch RNase-Behandlung erreicht, weil die RNA sonst bei der Hybridisierung interferieren könnte. In vitro Amplifizierung ermöglicht eine wesentliche Vermehrung der Target-Sequenz und erhöht so die Empfindlichkeit der Methode um zwei Größenordnungen. Das Backen sorgt für die Zuverlässigkeit der festen Bindung der DNA an das Filter. Die Behandlung des Filters nach dem Backen verhindert unspezifische Bindungen

und sorgt auch für Zuverlässigkeit. Die Wäsche des Filters nach Hybridisierung entfernt überflüssige, oder unspezifisch gebundene, markierte Onkogen-DNA Proben und trägt auch zur Zuverlässigkeit bei.

Es sind zahlreiche Modifizierungen möglich.

Eine quantitative Auswertung des positiven Tests ist möglich.

Eine semiquantitative Auswertung kann auch durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Intensität des schwarzen Flecks am Röntgenfilm durch Densitometrie gemessen und können quantitative Vergleiche gemacht werden (Reflectance Densitometer, Bio-Rad, Richmond CA 94804, USA).

Quantitativer Test:

Wenn ein Blutplasma-DNA mit einer Onkogen Probe einen positiven Test gezeigt hat, kann die relative Menge durch das Dilutionsverfahren bestimmt werden. In diesem Fall wird aus der Blutplasma-DNA eine 1:2 Serialverdünnung gemacht und wird jede Verdünnung durch Hybridisierung getestet. Die höchste Verdünnung, aus der noch ein positives Signal ausgeht, ist der Titer. So können bei der Verlaufskontrolle eines Patienten, während der Beobachtungszeit, quantitative Vergleiche durchgeführt werden. Auf diese Weise kann man z. B. die Amplifizierung eines der aktivierten Onkogene beobachten: Wenn während der Verlaufskontrolle der Titer eines Onkogens unproportionell erhöht wird im Vergleich zu anderen Onkogenen, bedeutet das die Amplifizierung dieses Onkogens.

Der Test ist positiv:

1. Wenn eine der durch Mutation veränderten Onkogen-Proben (Oligonucleotid-Proben) mit der Plasma-DNA ein positives Signal gibt.
2. Wenn, zwei oder mehrere zelluläre Onkogene, die nicht durch Mutation aktiviert sind, im Blutplasma nachweisbar sind.
3. Wenn, die Anwesenheit eines der Onkogene, das nicht durch Mutation

aktiviert ist, in höherem Titer nachweisbar ist.

Die Möglichkeiten 2 oder 3 können aber gelegentlich auch in nicht-bösartigen Krankheiten vorkommen, besonders in Zuständen mit Fieber und großem Zellabbau. In diesen Fällen wird der Zeitablauf entscheidend sein: In bösartigen Krankheiten bleibt die Positivität, oder steigt sie sogar, während sie in den nicht-bösartigen Fällen abklingt.

Im allgemeinen bekommt man einen positiven Test im Fall einer bösartigen Krankheit meistens, wenn die Plasma-DNA erst nur mit der Onkogen-Gruppe A (siehe oben) hybridisierte, weil diese Onkogene in allen bzw. beinahe in allen Sorten von Bösartigkeiten aktiviert sind. Seltener braucht man die Hybridisierung auf die Gruppe B auszuweitern.

Wenn man die Krebsart kennt (in der Verlaufskontrolle) oder Verdacht hat auf eine Krebsart, kann man solche Onkogene als Proben verwenden, die in dieser Krebsart besonders häufig aktiviert sind. Es werden noch immer neue Onkogene entdeckt. Diese kann man zukünftig gegebenenfalls auch als Probe benutzen.

Wenn man aber wissen möchte, welche aktivierten Onkogene in der Blutbahn anwesend sind (Plasma-Onkogen-Profil), muß man die Blutplasma-DNA mit allen Onkogenen von Gruppe A und B und seltener von Gruppe C hybridisieren. Dasselbe muß man tun, wenn man das Erscheinen von neuen Onkogenen in der Blutbahn während der Krankheitsablauf erfassen möchte, was aufgrund der prognostischen und therapeutischen Bedeutung sehr wichtig ist.

Es ist möglich, spezifische DNA-Fragmente von zwei oder mehreren verschiedenen Onkogenen aus dem Blutplasma simultan in demselben System, z.B. in einem Röhrchen, spezifisch zu amplifizieren. Die in vitro Amplifizierung benötigt keine intakten, vollständigen Onkogen-DNA Moleküle. In Anwesenheit eines einzigen, relativ kleinen Onkogen-spezifischen DNA-Fragments, das die Strecke zwischen den 5' Enden der zwei Oligonukleotid-Primere überbrückt, findet eine spezifische Amplifizierung durch Primer-Kettenreaktion statt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Untersuchung einer azellularen biologischen Flüssigkeit auf die Anwesenheit von zellulärer Onkogen-DNA, bzw. deren Fragmente, als Malignitätstest, bei dem man
 - a) aus der azellularen biologischen Flüssigkeit die DNA konzentriert oder trennt,
 - b) das so erhaltene DNA-Produkt denaturiert und in dieser Form entweder auf einem festen Träger immobilisiert oder frei in Lösung beläßt,
 - c) das Produkt des Schrittes b) mit markierten Onkogen-DNA- oder Oligonukleotid-Proben in Kontakt bringt, um diese mit der DNA zu hybridisieren, wenn komplementäre Sequenz vorliegt, die überflüssige und nicht spezifisch gebundene markierte Onkogen-DNA- oder Oligonukleotid-Proben entfernt und
 - d) das Produkt auf die Anwesenheit markierter DNA oder Oligonukleotid bestimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Schritt a) eine enzymatische Amplifizierung in vitro mit der Plasma-DNA durchführt, um die spezifischen Target-Sequenzen der Onkogene zu vermehren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die azellulare biologische Flüssigkeit menschliches Blutplasma ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe radioisotopisch markierte Onkogen-DNA ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,

daß die Probe nicht radioisotopisch markierte, vorzugsweise mit Biotin markierte Onkogen-DNA ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Blutplasma vor der Trennung der DNA und der Immobilisierung der DNA auf dem festen Träger mit einem organischen Lösungsmittel behandelt wird, um Eiweißmaterial in einer organischen Phase zu entfernen und um die DNA in der wässrigen Phase zu erhalten.
7. Verfahren nach Anspruch 4 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung auf Anwesenheit markierter DNA mittels autoradiographischer Technik durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung auf Anwesenheit markierter DNA mittels Enzymaffinitätstest durch Farbreaktion durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als festes Substrat reine Nitrocellulose oder Nylon verwendet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die Immobilisierung ein Vakuum eingesetzt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) das Plasma mit einem Detergens und proteolytischen Enzym in Kontakt bringt;
 - b) das Produkt der Stufe a) mit einer proteindenaturierenden Lösung, wie Guanidinium-isothiocyanat vermischt und behandelt;
 - c) das Produkt der Stufe b) mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert unter Bildung einer im wesentlichen proteinfreien wässrigen Phase, die die DNA enthält;
 - d) das Produkt der Stufe c) mit einem Detergens und einem proteolytischen Enzym in Kontakt bringt, inkubiert, und dann die Extrakt-

- tion der Stufe c) wiederholt;
- e) das Produkt der Stufe d) mit (2 vol) Äthanol präzipitiert, wäscht und in sterilem Wasser löst;
 - f) das Produkt der Stufe e) einer RNase Enzym Behandlung unterzieht um die vorhandene RNA abzubauen und zu entfernen und dann die Extraktion der Stufe d) wiederholt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von durch Punktmutation veränderter Onkogene die Plasma-DNA einer in vitro enzymatischen Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion unterzogen wird, um sie zu vermehren.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) das Produkt der Stufe f) behandelt und dann denaturiert;
 - b) das Produkt der Stufe a) auf ein festes Substrat aufträgt und durch Backen im Vakuum immobilisiert;
 - c) das feste Substrat der Stufe b) mit einer Lösung von markierter Onkogen-DNA Probe in Kontakt bringt, um sie mit der auf dem festen Substrat immobilisierten DNA zu hybridisieren;
 - d) das Produkt der Stufe c) im Fall radioisotopisch markierter Onkogen-DNA Probe, durch Autoradiographie bestimmt;
 - e) das Produkt der Stufe c) im Fall nicht-isotopisch markierter Onkogen-DNA Probe durch Enzymaffinitätstest durch Farbreaktion bestimmt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man das feste Substrat der Stufe b) behandelt, um eine weitere Bindung von Nukleinsäure daran zu hindern.
15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die verbliebene nicht-radioaktive Markierungssubstanz des festen Substrats, die durch die Hybridisierung zwischen Plasma-DNA und der markierten Onkogen-DNA gebunden ist, mittels Enzymaffinitätstest durch Farbreaktion bestimmt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet,

daß man als Onkogen-DNA-Probe eine individuelle Onkogen-DNA oder eine Mischung individueller Onkogen-DNAs nimmt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Onkogen-DNA, die mit der auf dem festen Substrat gebundenen Plasma-DNA hybridisierte, entfernt, um das feste Substrat mit der daran verbliebenen Plasma-DNA mit einer neuen Onkogen-DNA-Probe wieder zu hybridisieren (rehybridisieren).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 88/00384

| | | |
|---|---|---|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) * | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC | | |
| Int.Cl. ⁴ : C 12 Q 1/68 | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched ⁷ | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| Int.Cl. ⁴ | C 12 Q 1/00; G 01 N 33/00 | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸ | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ | | |
| Category * | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
| X | WO, A, 87/02064 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 9 April 1987 see page 8, line 5 - page 12, line 3; page 12, example 1; page 13, example 2; page 14, example 3; page 18, line 2 - page 21, line 14 -- | 1,3-6,8,11, 13,17 |
| X | GB, A, 2095833 (BETHESDA RESEARCH LABORATOR- IES) 6 October 1982 see page 1, lines 21-34; page 1, lines 51-120; page 2, lines 94-119; page 2, line 126 - page 3, line 1; page 3, lines 10-113 -- | 1,3,4,6,7, 9-14 |
| X | US, A, 4483920 (D. GILLESPIE ET AL.) 20 November 1984 see column 1, line 55 - column 3, line 28; column 6, example 1; column 9, example 4; column 10, lines 42-50; column 10, table 3; column 11, line 10 - column 12, line 21 -- | 1,3,9,11,13, 14 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | | Date of Mailing of this International Search Report |
| 06 September 1988 (06.09.88) | | 26 September 1988 (26.09.88) |
| International Searching Authority European Patent Office | | Signature of Authorized Officer |

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) | | |
|--|--|------------------------|
| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
| X | EP, A, 0142299 (FUJIREBIO INC.) 22 May 1985 see page 1, lines 22-37; page 2, lines 5-21; page 2, line 36 - page 3, line 23; page 3, lines 24-28; page 10, line 2 - page 11, line 21 -- | 1,3-5,8,9, 11,13,17 |
| X | EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS) 20 June 1984 see page 1, lines 23-31; page 4, line 24 - page 5, line 24 -- | 1,7,8,11,13 |
| X | EP, A, 0201184 (CETUS CORPORATION) 17 December 1986 see column 3, lines 48-55; column 20, lines 5-15; column 44, lines 20-50; column 45, line 45 - column 46, line 2 ----- | 2,12 |

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

DE 8800384
SA 22931

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 19/09/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A- 8702064 | 09-04-87 | FR-A, B 2588383 | 10-04-87 |
| | | EP-A- 0238593 | 30-09-87 |
| GB-A- 2095833 | 06-10-82 | FR-A- 2502785 | 01-10-82 |
| | | DE-A- 3211311 | 07-10-82 |
| | | JP-A- 58031998 | 24-02-83 |
| | | US-A- 4446237 | 01-05-84 |
| US-A- 4483920 | 20-11-84 | Keine | |
| EP-A- 0142299 | 22-05-85 | JP-A- 60091999 | 23-05-85 |
| EP-A- 0111340 | 20-06-84 | JP-A- 59122499 | 14-07-84 |
| | | US-A- 4588682 | 13-05-86 |
| | | CA-A- 1211058 | 09-09-86 |
| EP-A- 0201184 | 12-11-86 | AU-A- 5532286 | 02-10-86 |
| | | AU-A- 5532386 | 02-10-86 |
| | | EP-A- 0200362 | 05-11-86 |
| | | JP-A- 61274697 | 04-12-86 |
| | | JP-A- 62000281 | 06-01-87 |
| | | US-A- 4683202 | 28-07-87 |
| | | CA-A- 1237685 | 07-06-88 |

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/DE 88/00384**

| | | |
|--|--|---|
| I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC | | |
| Int. Cl. ⁴ - C 12 Q 1/68 | | |
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE | | |
| Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷ | | |
| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | |
| Int. Cl. ⁴ | C 12 Q 1/00; G 01 N 33/00 | |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸ | | |
| | | |
| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ | | |
| Art* | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ |
| X | WO, A, 87/02064 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 9. April 1987 siehe Seite 8, Zeile 5 - Seite 12, Zeile 3; Seite 12, Beispiel 1; Seite 13, Beispiel 2; Seite 14, Beispiel 3; Seite 18, Zeile 2 - Seite 21, Zeile 14 <div style="text-align: center;">---</div> | 1, 3-6, 8, 11, 13, 17 |
| X | GB, A, 2095833 (BETHESDA RESEARCH LABORATORIES) 6. Oktober 1982 siehe Seite 1, Zeilen 21-34; Seite 1, Zeilen 51-120; Seite 2, Zeilen 94 - 119; Seite 2, Zeilen 126 - Seite 3, Zeile 1; Seite 3, Zeilen 10-113 <div style="text-align: center;">---</div> | 1, 3, 4, 6, 7, 9-14 |
| X | US, A, 4483920 (D. GILLESPIE ET AL.) 20. November 1984 <div style="text-align: right;">./.</div> | 1, 3, 9, 11, 13, 14 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div> | | |
| IV. BESCHEINIGUNG | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 6. September 1988 | | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">26 SEP 1988</div> |
| Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> | | Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: right;"> P.C.G. VAN DER PUTTEN </div> |

| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) | | Betr. Anspruch Nr. |
|--|---|------------------------|
| Art * | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile | |
| | siehe Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 3, Zeile 28; Spalte 6, Beispiel 1; Spalte 9, Beispiel 4; Spalte 10, Zeile 42-50; Spalte 10, Tabelle 3; Spalte 11, Zeile 10 - Spalte 12, Zeile 21 --- | |
| X | EP, A, 0142299 (FUJIREBIO INC.) 22. Mai 1985 siehe Seite 1, Zeilen 22-37; Seite 2, Zeilen 5-21; Seite 2, Zeile 36 - Seite 3, Zeile 23; Seite 3, Zeilen 24-28; Seite 10, Zeile 2 - Seite 11, Zeile 21 --- | 1,3-5,8,9, 11,13,17 |
| X | EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS) 20. Juni 1984 siehe Seite 1, Zeile 23-31; Seite 4, Zeile 24 - Seite 5, Zeile 24 --- | 1,7,8,11,13 |
| X | EP, A, 0201184 (CETUS CORPORATION) 17. Dezember 1986 siehe Spalte 3, Zeilen 48-55; Spalte 20, Zeilen 5-15; Spalte 44, Zeilen 20-50; Spalte 45, Zeile 45 - Spalte 46, Zeile 2 ----- | 2,12 |

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

DE 8800384
SA 22931

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/09/88
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|---|--|
| WO-A- 8702064 | 09-04-87 | FR-A,B 2588383 EP-A- 0238593 | 10-04-87 30-09-87 |
| GB-A- 2095833 | 06-10-82 | FR-A- 2502785 DE-A- 3211311 JP-A- 58031998 US-A- 4446237 | 01-10-82 07-10-82 24-02-83 01-05-84 |
| US-A- 4483920 | 20-11-84 | Keine | |
| EP-A- 0142299 | 22-05-85 | JP-A- 60091999 | 23-05-85 |
| EP-A- 0111340 | 20-06-84 | JP-A- 59122499 US-A- 4588682 CA-A- 1211058 | 14-07-84 13-05-86 09-09-86 |
| EP-A- 0201184 | 12-11-86 | AU-A- 5532286 AU-A- 5532386 EP-A- 0200362 JP-A- 61274697 JP-A- 62000281 US-A- 4683202 CA-A- 1237685 | 02-10-86 02-10-86 05-11-86 04-12-86 06-01-87 28-07-87 07-06-88 |

EPH FORM 10073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.